

DOI: 10.16781/j.CN31-2187/R.20230022

· 论 著 ·

## 甘露糖加重载脂蛋白 E 缺陷小鼠的脂蛋白代谢紊乱

王珏睿<sup>1</sup>, 成晓翠<sup>1</sup>, 余征真<sup>1</sup>, 刘亚晋<sup>1</sup>, 章卫平<sup>1,2\*</sup>

1. 天津医科大学朱宪彝纪念医院 & 天津市内分泌研究所, 国家卫生健康委员会激素与发育重点实验室, 天津 300134

2. 海军军医大学(第二军医大学)基础医学院病理生理学教研室, 上海 200433

**[摘要]** **目的** 探讨甘露糖暴露对载脂蛋白(Apo)E缺陷小鼠高脂血症的影响及机制。**方法** 10只6周龄雄性ApoE基因缺陷小鼠采用高脂高胆固醇纯化饲料建立小鼠高脂血症模型,并分为对照组和甘露糖干预组,每组5只。对照组饲喂普通饮用水,甘露糖干预组饲喂含2%(质量体积分数)甘露糖的饮用水,持续4周。利用试剂盒检测小鼠血浆总胆固醇及甘油三酯水平,采用快速蛋白液相色谱法分离小鼠血浆脂蛋白并检测Apo和胆固醇水平,采用qPCR和蛋白质印迹法分别检测小鼠肝脏和肠道组织中脂蛋白代谢相关基因的mRNA和蛋白水平。**结果** 与对照组相比,甘露糖干预组小鼠的血浆甘油三酯和总胆固醇水平升高( $P<0.05$ ,  $P<0.01$ ),同时伴有极低密度脂蛋白中胆固醇和ApoB100蛋白水平显著升高、高密度脂蛋白中ApoA1和ApoA4水平降低。甘露糖干预组小鼠肝脏和肠道中ApoA1蛋白表达较对照组下调,而ApoA4蛋白表达下调仅见于肠道。**结论** 甘露糖暴露可影响ApoE基因缺陷小鼠的脂蛋白代谢,加重高脂血症。

**[关键词]** 甘露糖;载脂蛋白;极低密度脂蛋白;胆固醇;高脂血症

**[引用本文]** 王珏睿,成晓翠,余征真,等.甘露糖加重载脂蛋白E缺陷小鼠的脂蛋白代谢紊乱[J].海军军医大学学报,2023,44(8):925-931. DOI:10.16781/j.CN31-2187/R.20230022.

## Mannose aggravates lipoprotein metabolism disorder in apolipoprotein E-deficient mice

WANG Juerui<sup>1</sup>, CHENG Xiaocui<sup>1</sup>, YU Zhengzhen<sup>1</sup>, LIU Yajin<sup>1</sup>, ZHANG Weiping<sup>1,2\*</sup>

1. NHC Key Laboratory of Hormones and Development, Tianjin Institute of Endocrinology and Chu Hsien-I Memorial Hospital, Tianjin Medical University, Tianjin 300134, China

2. Department of Pathophysiology, College of Basic Medical Sciences, Naval Medical University (Second Military Medical University), Shanghai 200433, China

**[Abstract]** **Objective** To investigate the effect and mechanism of mannose exposure on the hyperlipidemia in apolipoprotein (Apo)E-deficient mice. **Methods** Ten ApoE-deficient mice (6 weeks old, male) were divided into control group and mannose group (5 in each group). A hyperlipidemia model was established using high fat and high cholesterol purified feed. The mice in the control group were fed with drinking water, while the mice in the mannose group were fed with drinking water containing 2% mannose (w/v). Plasma total cholesterol and triglyceride concentrations were measured using their respective kits. Plasma lipoproteins were separated by fast protein liquid chromatography, and the Apo and cholesterol levels were measured. The mRNA and protein expression levels of lipoprotein metabolism-related genes in the liver and jejunum were detected by quantitative polymerase chain reaction and Western blotting, respectively. **Results** Compared with the control group, the levels of plasma triglyceride and total cholesterol of mice in the mannose group were significantly increased ( $P<0.05$ ,  $P<0.01$ ), accompanied by significantly higher levels of cholesterol and ApoB100 protein in very low-density lipoprotein and lower levels of ApoA1 and ApoA4 in high-density lipoprotein. The expression of ApoA1 protein in the liver and jejunum of mice in the mannose group was downregulated compared to the control group, while the downregulation of ApoA4 protein expression was only observed in the jejunum. **Conclusion** Mannose exposure affects lipoprotein metabolism and aggravates the hyperlipidemia in ApoE-deficient mice.

**[Key words]** mannose; apolipoprotein; very low-density lipoprotein; cholesterol; hyperlipidemia

[收稿日期] 2023-01-28

[接受日期] 2023-04-12

[基金项目] 国家自然科学基金重大研究计划(91857203),天津市教育委员会自然科学基金(2019KJ194). Supported by Major Research Plan of National Natural Science Foundation of China (91857203) and Natural Science Foundation of Tianjin Municipal Education Commission (2019KJ194).

[作者简介] 王珏睿,硕士生. E-mail: jerrywang1258@163.com

\*通信作者( Corresponding author ). Tel: 021-81871018, E-mail: zbtb20@aliyun.com

[ Citation ] WANG J, CHENG X, YU Z, et al. Mannose aggravates lipoprotein metabolism disorder in apolipoprotein E-deficient mice[J]. Acad J Naval Med Univ, 2023, 44(8): 925-931. DOI: 10.16781/j.CN31-2187/R.20230022.

甘露糖是葡萄糖的同分异构体,主要来源于植物和水果。正常人血液中甘露糖水平很低,约为 50  $\mu\text{mol/L}$ ,主要参与蛋白的糖基化修饰,具有免疫调节等重要生物学功能。以肥胖、糖尿病、脂肪肝和高脂血症等为特征的代谢综合征是动脉粥样硬化与心脑血管疾病的重要独立危险因素<sup>[1-2]</sup>。随着社会经济发展和人们生活方式的转变,代谢综合征的发病率呈现快速上升趋势<sup>[3]</sup>。多组学分析发现血中甘露糖水平与肥胖患者的胰岛素抵抗和高胆固醇血症密切相关<sup>[4-5]</sup>,提示甘露糖代谢异常可能参与糖脂代谢紊乱的病理生理过程。此后的干预性研究却发现,给予生长发育期的离乳后小鼠甘露糖饮水可改变其肠道菌群,从而抑制能量摄入,对成年后的高脂诱导肥胖具有保护作用;然而,仅在成年阶段进行甘露糖干预并未观察到这种代谢调节效应<sup>[6]</sup>。因此,有关甘露糖在代谢性疾病中的确切作用及其相关机制有待深入研究。载脂蛋白 (apolipoprotein, Apo) E 是极低密度脂蛋白 (very low-density lipoprotein, VLDL) 和高密度脂蛋白 (high-density lipoprotein, HDL) 的重要组成部分,参与肝脏对乳糜微粒和 VLDL 残基的摄取。ApoE 基因缺陷 (*ApoE*<sup>-/-</sup>) 小鼠血胆固醇主要为 VLDL 中的胆固醇,自发形成高胆固醇血症。本研究利用 *ApoE*<sup>-/-</sup> 小鼠模型观察甘露糖饮水对高脂血症的影响,并探讨其相关机制。

## 1 材料和方法

1.1 实验动物与试剂 10只6周龄的雄性 *ApoE*<sup>-/-</sup> C57BL/6J 小鼠 (平均体重 17 g) 购于江苏集萃药康生物科技股份有限公司 [动物生产许可证号: SCXK (苏) 2018-0008]。所有小鼠均自由饮水、进食,饲养在天津医科大学朱宪彝纪念医院内分泌研究所 SPF 级实验动物中心,环境温度 25  $^{\circ}\text{C}$ ,相对湿度 40%~70%,12 h 光照/12 h 黑暗。所有实验动物研究均通过天津医科大学实验动物伦理委员会审批。甘露糖 (货号 G8370) 购于北京索莱宝科技有限公司;甘油三酯 (triglyceride, TG; 货号 100000220)、总胆固醇 (total cholesterol, TC; 货号 100000180) 检测试剂盒购于中生北控生物科

技股份有限公司;Amplex<sup>TM</sup> Red 胆固醇检测试剂盒 (货号 A12216) 购于美国 ThermoFisher 公司;游离脂肪酸 (free fatty acid, FFA) 检测试剂盒购于美国 Sigma 公司 (货号 MAK044);总 RNA 提取试剂盒 (TRIzol 提取法)、cDNA 合成试剂盒和 qPCR 试剂盒购于北京全式金生物技术有限公司;血糖仪及检测试纸均为瑞士 Roche 公司产品;啮齿类动物高脂高胆固醇纯化饲料 (货号 MD12017, 含 22.5% 蛋白质、45% 碳水化合物、20% 脂肪、1.25% 胆固醇、0.5% 胆酸钠) 购于江苏美迪森生物医药有限公司。

1.2 小鼠高脂血症模型的建立与分组 10只 *ApoE*<sup>-/-</sup> 小鼠随机分为对照组和甘露糖干预组,每组 5 只。两组小鼠均给予高脂高胆固醇纯化饲料喂养,对照组饲喂普通饮用水,甘露糖干预组饲喂含 2% (质量体积分数) 甘露糖的饮用水<sup>[6]</sup>,持续 4 周。每天记录小鼠进食量和饮水量,每周记录小鼠的体重,造模前及造模 1 周、造模 2 周时取尾尖血测随机血糖。4 周后用三溴乙醇麻醉小鼠,眼眶静脉丛采血并进行抗凝处理,10 000 $\times$ g 离心 3 min 取血浆,收集肝脏和肠道组织进行后续检测。

1.3 qPCR 检测相关基因的表达 小鼠肝脏组织采用总 RNA 提取试剂盒提取总 RNA,再使用 cDNA 合成试剂盒反转录成 cDNA。反转录反应条件:37  $^{\circ}\text{C}$  15 min,65  $^{\circ}\text{C}$  10 min,42  $^{\circ}\text{C}$  60 min。应用 PubMed Primer-BLAST 设计基因引物,内参基因为 *36B4*,目的基因及相关引物序列见表 1。以 cDNA 为模板,加入相应引物进行 qPCR 扩增。qPCR 反应条件:95  $^{\circ}\text{C}$  15 s,60  $^{\circ}\text{C}$  30 s,72  $^{\circ}\text{C}$  30 s 40 个循环,在延伸阶段检测荧光强度;72  $^{\circ}\text{C}$  10 s。采用  $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$  法计算目的基因的相对表达量。

1.4 脂蛋白测定及组分分离 采用快速蛋白液相色谱 (fast protein liquid chromatography, FPLC) 系统 (日本岛津公司;泵单元:LC-20AT;进样器:SIL-20A;检测器:SPD-M20A;系统控制器:CBM-20A;工作站:LCsolution Multi-PDA),使用 2 根 Superose 6 (型号 17-5172-01,10/300 GL) 层析柱串联,全血肝素抗凝后离心获得血浆,将同组内 5 份血浆等体积混合成 1 份样本,进样体积

100  $\mu$ L, 洗脱缓冲液 (50 mmol/L PBS、150 mmol/L 氯化钠、pH 7.4) 流速为 0.4 mL/min, 以 400  $\mu$ L 为 1 个组分分部收集洗脱液, 收集时间段为洗脱 31~90 min, 共收集 60 个组分, 于 -20  $^{\circ}$ C 保存。根据脂蛋白粒径不同, 结合 280 nm 处光密度值

( $D_{280}$ ) 将收集的组分大致分为 3 段, 第 31~46 组分为 VLDL、第 48~63 组分为低密度脂蛋白 (low-density lipoprotein, LDL)、第 68~83 组分为 HDL。测定  $D_{280}$ , 即脂蛋白的蛋白质含量。采用 Amplex<sup>TM</sup> Red 胆固醇检测试剂盒测定各组分中的胆固醇水平。

表 1 qPCR 引物序列

Tab 1 Sequences of primers for qPCR

Gene	Forward (5'-3')	Reverse (5'-3')
<i>SREBP1c</i>	GGAGCCATGGATTGCACATT	GCTTCCAGAGAGGAGGCCAG
<i>FAS</i>	TGGGTTCTAGCCAGCAGAGT	ACCACCAGAGACCGTTATGC
<i>ACC</i>	GGATGGGCGGAATGGTCTC	AAATGCGGTCTCTCTCAAACCTTA
<i>SREBP2</i>	GAACACCAAGCATGGAGAG	GACAGGAAAGAGAGGGGAA
<i>HMGCR</i>	CTCCCGTCGTGACCTCAAAGAAAG	GAGCTGCCGGCGAATAGACACA
<i>SQLE</i>	AGGCCTCTCAGAATGGTCGTC	AAGGGCCCGTGGTTTTGTAG
<i>ABCG5</i>	TGCCCTTTCTGAGTCCAGAG	GTGCTCTTTCAATGTTCTCCAG
<i>ABCG8</i>	ATGAGCTGGAAGACGGGCTG	GCCAGTGAGAGCAAGGCTGA
<i>CD36</i>	AAAGTTGCCATAATTGAGTCCT	TCCGAACACAGCGTAGATAG
<i>LDLR</i>	AGGCTGTGGGCTCCATAGG	TGCGGTCCAGGGTCACT
<i>ApoB</i>	TCACCATTTGCCCTCAACCTAA	GAAGGCTCTTTGGAAGTGAAAC
<i>MTTP</i>	CCCTGCCTGTAGATAGCCTTTTCAT	CGCGAGTCTAAAACCCGAGTG
<i>ApoA1</i>	GGCACGTATGGCAGCAAGATGA	TTGGCCCAAGGAGGAGGATTCAA
<i>ApoA4</i>	GCTCCAGCTGACCCCATACATCC	GCTCTCCGCGTCTCTTCTCATCT
<i>36B4</i>	TGGTTGCTTTGGCGGGATTAGTCG	AAGCGCGTCTGGCATTGTCTGTG

qPCR: Quantitative polymerase chain reaction; SREBP1c: Sterol regulatory element-binding protein 1c; FAS: Fatty acid synthase; ACC: Acetyl-CoA carboxylase; SREBP2: Sterol regulatory element-binding protein 2; HMGCR: 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase; SQLE: Squalene epoxidase; ABCG5: Adenosine triphosphate (ATP)-binding cassette subfamily G member 5; ABCG8: ATP-binding cassette subfamily G member 8; LDLR: Low-density lipoprotein receptor; ApoB: Apolipoprotein B; MTTP: Microsomal triglyceride transfer protein; ApoA1: Apolipoprotein A1; ApoA4: Apolipoprotein A4; 36B4: Ribosomal protein, large, P0.

1.5 蛋白质印迹法检测相关蛋白的表达 将 FPLC 收集的各组分按 4 : 1 的体积比加入上样缓冲液, 在 95  $^{\circ}$ C 金属浴中变性 10 min 制备蛋白质样品。干冰上取小鼠肝脏、肠道组织, 加入尿素裂解液 (25 mmol/L Tris-HCl, 8 mol/L 尿素, 1% SDS, 1 mmol/L EDTA, 0.7 mol/L 二硫苏糖醇, pH 7.4), 室温匀浆, 12 000  $\times$ g 离心 10 min, 收集上清液。通过 SDS-PAGE 分离蛋白质, 然后转印至 PVDF 膜。用 5% 脱脂牛奶室温封闭 1 h, 分别加 ApoB 抗体 (稀释比例 1 : 1 000)、ApoA1 抗体 (稀释比例 1 : 1 000)、ApoA4 抗体 (稀释比例 1 : 1 000) 和  $\beta$ -肌动蛋白抗体 (稀释比例 1 : 5 000, 美国 Proteintech 公司) 孵育过夜, 用 TBST 漂洗 3 次后, 加入 HRP 标记的二抗 (稀释比例 1 : 5 000, 美国 Jackson 公司), 室温孵育 1 h, 再用 TBST 漂洗 3 次。

加入 ECL 试剂 (美国 Pierce 公司) 显影后, 用 MiniChem 610 plus 化学发光检测仪进行曝光。

1.6 小鼠肝脏脂质提取与检测 在干冰上称取 30 mg 小鼠肝脏组织置于匀浆管内, 放入研磨珠, 加 500  $\mu$ L 5% Triton X-100 溶液, 用多通道匀浆仪 65 Hz 匀浆 120 s。匀浆后取出研磨珠, 将匀浆管置于水浴锅, 缓慢加热, 从室温升至 90  $^{\circ}$ C, 并在 90  $^{\circ}$ C 下持续加热 5 min; 自然冷却, 重复加热 1 次。在 4  $^{\circ}$ C 下以 12 000  $\times$ g 离心 3 min, 吸取上清至新的 1.5 mL EP 管中, 按照 TG 检测试剂盒和 TC 检测试剂盒说明书分别检测小鼠肝脏和血浆中的 TG、TC 水平, 按照 FFA 检测试剂盒说明书检测血浆中 FFA 水平。

1.7 统计学处理 应用 GraphPad Prism 9.5.1 (5.28) 软件处理和分析数据。计量资料均符合正态分布, 以  $\bar{x} \pm s$  表示, 组间比较采用独立样本  $t$  检验。检验

水准 ( $\alpha$ ) 为 0.05。

## 2 结果

2.1 甘露糖饮水加重  $ApoE^{-/-}$  高脂血症小鼠血脂异常 采用高脂高胆固醇纯化饲料喂养  $ApoE^{-/-}$  小鼠建立高脂血症小鼠模型, 观察甘露糖暴露对高脂血症小鼠脂代谢的影响。在 4 周观察期内, 仅在第 2 周观察到甘露糖干预组小鼠的体重比对照组降低 ( $P < 0.05$ ), 后又恢复至对照组水平 (图 1A); 甘露糖干预组小鼠的进食量 [ $(2.19 \pm 0.19)$  g/d vs  $(2.08 \pm 0.20)$  g/d、饮水量 [ $(3.63 \pm 0.62)$  g/d vs  $(4.22 \pm 1.26)$  g/d 和随机血糖 (图 1B) 与对照组相比无明显变化 ( $P$  均  $> 0.05$ )。第 4 周时, 甘露糖干预组小鼠血浆 TG [ $(1.24 \pm 0.32)$  mmol/L vs  $(0.78 \pm 0.22)$  mmol/L,  $P < 0.05$ ] 和 TC [ $(31.96 \pm 3.77)$  mmol/L vs  $(21.67 \pm 3.95)$  mmol/L,  $P < 0.01$ ] 水平与对照组相比升高, 血浆 FFA 与对照组相比差异无统计学意义 [ $(10.71 \pm 4.20)$  mmol/L vs  $(6.54 \pm 3.34)$  mmol/L,  $P > 0.05$ ]。通过 FPLC 分

离小鼠血浆得到不同组分, 与对照组相比, 甘露糖干预组 VLDL 的蛋白质和胆固醇水平均升高, 而 HDL 的蛋白质含量降低、胆固醇水平无明显差异 (图 2)。上述结果表明甘露糖暴露可加重  $ApoE^{-/-}$  小鼠的高脂血症表型。

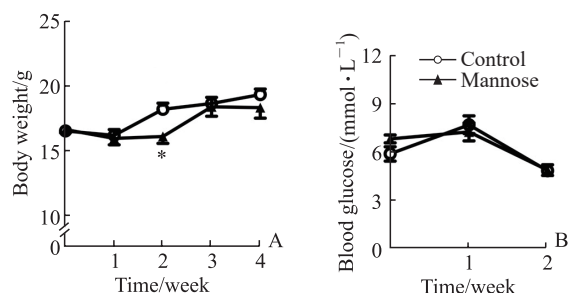


图 1 甘露糖饮水对高脂高胆固醇纯化饲料喂养的  $ApoE^{-/-}$  小鼠体重和血糖的影响

Fig 1 Effects of mannose drink on body weight or blood glucose in  $ApoE^{-/-}$  mice fed with high fat and high cholesterol purified feed

A: Body weight; B: Random blood glucose. \* $P < 0.05$  vs control group.  $n = 5$ ,  $\bar{x} \pm s$ . ApoE: Apolipoprotein E.

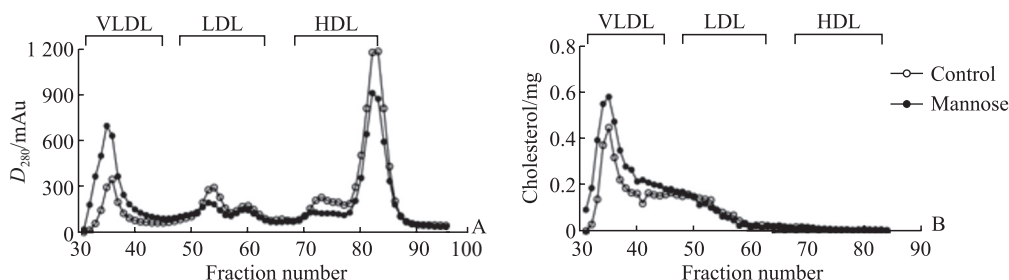


图 2 甘露糖饮水加重高脂高胆固醇纯化饲料喂养的  $ApoE^{-/-}$  小鼠的血脂异常

Fig 2 Mannose drink aggravates hyperlipidemia in  $ApoE^{-/-}$  mice fed with high fat and high cholesterol purified feed

A: Protein of plasma fractions; B: Cholesterol of plasma fractions. ApoE: Apolipoprotein E; VLDL: Very low-density lipoprotein; LDL: Low-density lipoprotein; HDL: High-density lipoprotein; mAu: Milli absorbance unit.

2.2 甘露糖饮水不影响  $ApoE^{-/-}$  高脂血症小鼠肝脏的脂质含量 与对照组相比, 甘露糖饮水 4 周后并没有导致  $ApoE^{-/-}$  小鼠肝脏 TG [ $(14.35 \pm 2.61)$  mg/g vs  $(14.03 \pm 4.49)$  mg/g] 和 TC [ $(21.80 \pm 4.14)$  mg/g vs  $(16.57 \pm 5.14)$  mg/g] 水平的显著变化 ( $P$  均  $> 0.05$ )。qPCR 检测结果显示, 与对照组相比, 甘露糖干预组小鼠肝脏脂肪酸合成相关基因固醇调节元件结合蛋白 (sterol regulatory element-binding protein, *SREBP*) *1c*、脂肪酸合成酶 (fatty acid synthase, *FAS*)、乙酰辅酶 A 羧化酶 (acetyl-CoA carboxylase, *ACC*)、胆固醇合成相关基因 *SREBP2*、羟甲基戊二酸单酰辅酶 A 还原酶 (3-hydroxy-3-

methylglutaryl-CoA reductase, *HMGCR*) 和角鲨烯环氧酶 (squalene epoxidase, *SQLE*), 胆固醇外排相关基因 ATP 结合盒转运蛋白 (ATP-binding cassette transporter, *ABC*) *G5*、*ABCG8*, 以及胆固醇摄取相关基因 *CD36*、低密度脂蛋白受体 (low-density lipoprotein receptor, *LDLR*) 的 mRNA 表达水平均未明显改变 ( $P$  均  $> 0.05$ , 图 3)。这些结果提示甘露糖加重  $ApoE^{-/-}$  高脂血症小鼠脂质代谢异常可能不是通过影响肝脏脂质合成、外排、摄取来实现的。

2.3 甘露糖饮水加重  $ApoE^{-/-}$  高脂血症小鼠脂蛋白的代谢紊乱 蛋白质印迹法检测结果显示, 与对照组相比, 甘露糖干预组小鼠血浆脂蛋白在对应

于VLDL的第35~37组中ApoB100蛋白水平明显增加(图4A),而在对应于HDL的第73~77组中ApoA1和ApoA4蛋白水平明显降低(图4B)。肝脏和肠道是Apo合成的主要场所,本研究进一步检测了ApoE<sup>-/-</sup>小鼠肝脏VLDL合成与组装基因ApoB和微粒体甘油三酯转运蛋白(microsomal triglyceride transfer protein, MTTP)的mRNA和蛋白水平,结果显示两组之间没有明显差异(图4C、4D)。甘露糖干预组小鼠肝脏ApoA1和ApoA4的

mRNA水平与对照组相比无明显变化,但ApoA1蛋白水平降低(图4C、4D);同时肠道ApoB和ApoA4的mRNA水平较对照组降低(P均<0.05,图4E),但ApoB48蛋白水平与对照组相比无明显差异,而ApoA1和ApoA4蛋白水平均较对照组降低(图4F)。上述结果提示甘露糖暴露导致血中ApoA1蛋白水平降低可能是其在肠道和肝脏中表达水平下调的结果,而血中ApoA4蛋白水平降低可能是该Apo在肠道中表达水平下调的结果。

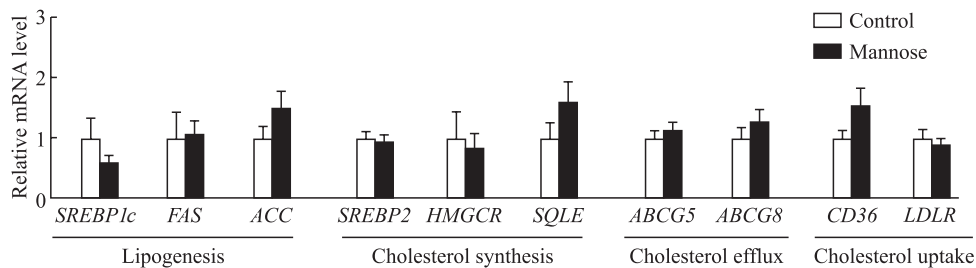


图3 甘露糖饮水不影响高脂高胆固醇纯化饲料喂养的ApoE<sup>-/-</sup>小鼠肝脏脂质代谢

Fig 3 Mannose drink did not affect liver lipid metabolism in ApoE<sup>-/-</sup> mice fed with high fat and high cholesterol purified feed

The mRNA expression levels in liver detected by quantitative polymerase chain reaction. n=5,  $\bar{x} \pm s$ . ApoE: Apolipoprotein E; SREBP1c: Sterol regulatory element-binding protein 1c; FAS: Fatty acid synthase; ACC: Acetyl-CoA carboxylase; SREBP2: Sterol regulatory element-binding protein 2; HMGCR: 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase; SQLE: Squalene epoxidase; ABCG5: Adenosine triphosphate (ATP)-binding cassette subfamily G member 5; ABCG8: ATP-binding cassette subfamily G member 8; LDLR: Low-density lipoprotein receptor.

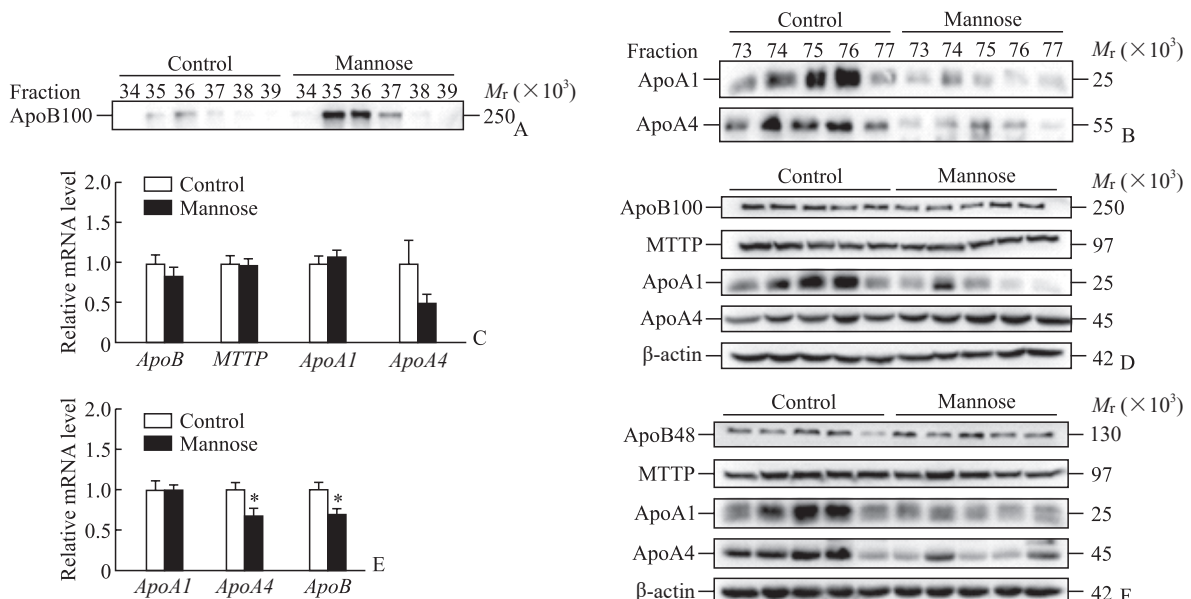


图4 甘露糖饮水对高脂高胆固醇纯化饲料喂养的ApoE<sup>-/-</sup>小鼠脂蛋白代谢的影响

Fig 4 Effect of mannose drink on lipoprotein metabolism in ApoE<sup>-/-</sup> mice fed with high fat and high cholesterol purified feed

A: The ApoB100 protein levels in plasma fractions detected by Western blotting; B: The ApoA1 and ApoA4 protein levels in plasma fractions detected by Western blotting; C: The mRNA levels of genes encoding Apos in liver detected by quantitative polymerase chain reaction; D: The protein levels in liver detected by Western blotting; E: The mRNA levels of Apo genes in jejunum detected by quantitative polymerase chain reaction; F: The protein levels in jejunum detected by Western blotting. \*P<0.05 vs control group. n=5,  $\bar{x} \pm s$ . Apo: Apolipoprotein; MTTP: Microsomal triglyceride transfer protein.

### 3 讨论

本研究结果显示甘露糖饮水在不影响进食量的情况下,加重 *ApoE*<sup>-/-</sup>小鼠的高甘油三酯血症和高胆固醇血症,而肝脏甘油三酯和胆固醇水平并没有明显变化,同时伴有血浆脂蛋白代谢的显著改变,VLDL中 ApoB100 蛋白水平增加,而 HDL 中 ApoA1 和 ApoA4 蛋白水平减少。*ApoE* 缺陷导致肝脏对乳糜微粒和 VLDL 残基的摄取障碍,引发高脂血症。甘露糖暴露进一步升高 *ApoE*<sup>-/-</sup>小鼠 VLDL 中 TG、TC 和 ApoB 水平,提示甘露糖加重了 VLDL 的代谢障碍。鉴于肝脏 TG 和胆固醇水平没有明显变化,推测甘露糖可能通过肝脏以外的组织加重 *ApoE*<sup>-/-</sup>小鼠的 VLDL 代谢障碍,包括肝外组织对 TG 的水解和摄取等。由于 *ApoE*<sup>-/-</sup>小鼠 HDL 胆固醇水平甚微,其 ApoA1 和 ApoA4 水平减少的病理学意义尚不清楚。这 2 种脂蛋白主要在肝脏和小肠合成,分泌入血。其中, ApoA1 主要参与胆固醇的反向转运,将游离胆固醇从外周组织运送到肝脏<sup>[7]</sup>,而 ApoA4 参与脂质吸收和代谢,具有抗动脉粥样硬化等生理功能<sup>[8]</sup>。本研究发现甘露糖暴露导致 *ApoE*<sup>-/-</sup>小鼠肝脏和肠道组织中 ApoA1 蛋白表达均下调,而 ApoA4 的蛋白下调仅见于肠道。有意思的是,甘露糖暴露并不影响肝脏和肠道中 *ApoA1* 的 mRNA 水平,而 *ApoA4* mRNA 水平降低仅见于肝脏,提示这 2 种 Apo 在肝脏和肠道中的表达调节机制不尽相同,可能存在组织特异性,但相关机制有待深入研究。*ApoE*<sup>-/-</sup>小鼠经甘露糖暴露后, *ApoA1* 和 *ApoA4* 在 mRNA 没有变化或变化有限的情况下,蛋白质水平明显下调,可能是转录后或翻译后机制作用的结果,包括 miRNA 或蛋白质降解等。

本研究结果为甘露糖暴露参与脂代谢紊乱的病理生理过程提供了直接的实验证据。基于人群的多组学分析显示,肥胖和高胆固醇血症患者的血甘露糖水平显著升高,并与胰岛素抵抗呈正相关<sup>[4-5]</sup>。本研究结果显示甘露糖饮水可加重 *ApoE*<sup>-/-</sup>小鼠的高脂血症,是对上述人群研究的支持。然而,既往的研究报道显示,正常成年小鼠经 2% 甘露糖饮水暴露后并未出现明显的代谢异常;而给予离乳后的生长发育期幼鼠甘露糖饮水则对高脂饮食诱导的肥胖具有保护作用,其机制与改善肠道菌群有关<sup>[6]</sup>。

这些结果提示甘露糖对脂代谢的影响非常复杂,可能与机体的生理和病理生理状态等因素有关。甘露糖饮水不能缓解高脂饮食诱导的成年小鼠脂代谢异常<sup>[6]</sup>,却加重 *ApoE*<sup>-/-</sup>小鼠的高脂血症,提示可能存在甘露糖调节脂蛋白代谢的 ApoE 非依赖途径。在正常小鼠体内,甘露糖诱导的 ApoE 非依赖性脂蛋白代谢途径的障碍可能被 ApoE 途径所代偿,而在 *ApoE*<sup>-/-</sup>小鼠中这种障碍却完全展现出来。具体机制还有待后续深入研究。

机体胆固醇来自食物及体内合成 2 个途径,血浆中的胆固醇主要由肝脏及小肠合成。小肠合成的乳糜微粒入血液后,甘露糖可能是通过脂蛋白脂肪酶抑制乳糜微粒中 TG 的水解;也可能通过作用于肝细胞膜上识别乳糜微粒的受体,抑制肝细胞摄取乳糜微粒,从而升高血脂<sup>[9]</sup>。临床上,高脂血症通常是遗传因素与环境因素共同作用的结果。因此,甘露糖暴露在高脂饮食诱导的高脂血症中的作用是个值得深入研究的课题。鉴于高脂血症是动脉粥样硬化的独立危险因素<sup>[10]</sup>,甘露糖暴露是否会影响动脉粥样硬化的病理进程也值得进一步观察。

甘露糖主要在肝脏中代谢,首先在己糖激酶的催化下转变为甘露糖-6-磷酸,然后在甘露糖磷酸异构酶催化下转化为果糖-6-磷酸,参与糖酵解;少部分可被磷酸甘露糖变位酶 2 异构化,参与蛋白质的糖基化修饰。近年研究发现,甘露糖可诱导调节性 T 细胞产生<sup>[11]</sup>,抑制巨噬细胞产生 IL-1 $\beta$ ,延缓实验性溃疡性结肠炎的进展<sup>[12]</sup>;此外,甘露糖还可抑制肿瘤生长<sup>[13]</sup>。这些研究显示甘露糖在免疫和炎症等相关疾病的防治中具有潜在应用价值。鉴于炎症在动脉粥样硬化中的重要作用,因此推测甘露糖也可能通过调节炎症反应影响动脉粥样硬化的病理过程。

总之,本研究揭示了甘露糖暴露对 *ApoE*<sup>-/-</sup>小鼠脂蛋白代谢的病理学效应,为解析甘露糖与代谢性疾病的关系提供了重要实验依据,同时也为阐释甘露糖暴露对动脉粥样硬化的影响奠定了基础。

### [参考文献]

- [1] HERMAN M A, BIRNBAUM M J. Molecular aspects of fructose metabolism and metabolic disease[J]. Cell Metab, 2021, 33(12): 2329-2354. DOI: 10.1016/j.cmet.2021.09.010.
- [2] SHI Y N, LIU Y J, XIE Z F, et al. Fructose and

- metabolic diseases: too much to be good[J]. *Chin Med J (Engl)*, 2021, 134(11): 1276-1285. DOI: 10.1097/CM9.0000000000001545.
- [3] 高珂,孟舒.心肺运动试验在代谢综合征患者中的应用[J].*海军军医大学学报*,2022,43(10):1120-1125. DOI: 10.16781/j.CN31-2187/R.20211113.  
GAO Y, MENG S. Application of cardiopulmonary exercise test in patients with metabolic syndrome[J]. *Acad J Naval Med Univ*, 2022, 43(10): 1120-1125. DOI: 10.16781/j.CN31-2187/R.20211113.
- [4] LEE S, ZHANG C, KILICARSLAN M, et al. Integrated network analysis reveals an association between plasma mannose levels and insulin resistance[J]. *Cell Metab*, 2016, 24(1): 172-184. DOI: 10.1016/j.cmet.2016.05.026.
- [5] BAI L, LI Q W, LI L M, et al. Plasma high-mannose and complex/hybrid *N*-glycans are associated with hypercholesterolemia in humans and rabbits[J]. *PLoS One*, 2016, 11(3): e0146982. DOI: 10.1371/journal.pone.0146982.
- [6] SHARMA V, SMOLIN J, NAYAK J, et al. Mannose alters gut microbiome, prevents diet-induced obesity, and improves host metabolism[J]. *Cell Rep*, 2018, 24(12): 3087-3098. DOI: 10.1016/j.celrep.2018.08.064.
- [7] CHYU K Y, SHAH P K. HDL/ApoA-1 infusion and *ApoA-1* gene therapy in atherosclerosis[J]. *Front Pharmacol*, 2015, 6: 187. DOI: 10.3389/fphar.2015.00187.
- [8] QU J, KO C W, TSO P, et al. Apolipoprotein A-IV: a multifunctional protein involved in protection against atherosclerosis and diabetes[J]. *Cells*, 2019, 8(4): 319. DOI: 10.3390/cells8040319.
- [9] LI H, LIU G, WAN X Q, et al. The zinc finger and BTB domain containing protein ZBTB20 regulates plasma triglyceride metabolism by repressing lipoprotein lipase gene transcription in hepatocytes[J]. *Hepatology*, 2022, 75(5): 1169-1180. DOI: 10.1002/hep.32176.
- [10] SANDESARA P B, VIRANI S S, FAZIO S, et al. The forgotten lipids: triglycerides, remnant cholesterol, and atherosclerotic cardiovascular disease risk[J]. *Endocr Rev*, 2019, 40(2): 537-557. DOI: 10.1210/er.2018-00184.
- [11] ZHANG D F, CHIA C, JIAO X, et al. D-mannose induces regulatory T cells and suppresses immunopathology[J]. *Nat Med*, 2017, 23(9): 1036-1045. DOI: 10.1038/nm.4375.
- [12] TORRETTA S, SCAGLIOLA A, RICCI L, et al. D-mannose suppresses macrophage IL-1 $\beta$  production[J]. *Nat Commun*, 2020, 11(1): 6343. DOI: 10.1038/s41467-020-20164-6.
- [13] GONZALEZ P S, O'PREY J, CARDACI S, et al. Mannose impairs tumour growth and enhances chemotherapy[J]. *Nature*, 2018, 563(7733): 719-723. DOI: 10.1038/s41586-018-0729-3.

[本文编辑] 孙岩